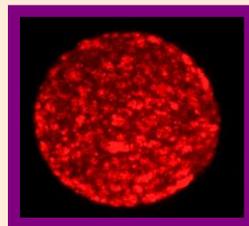
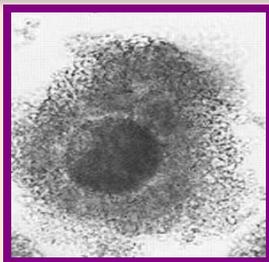


Инновационные эмбрио- и крио- технологии в разведении крупного рогатого скота: достижения, проблемы, перспективы

© КУЗЬМИНА Т.И.



от

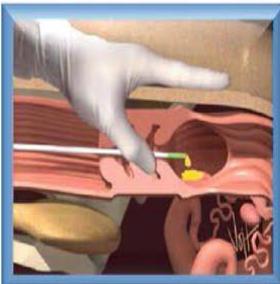
ооцита

к

эмбриону

Санкт-Петербург-Пушкин, 2024

ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ КЛЕТОЧНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ



1960/70

Искусственное осеменение



1970/80

Множественная овуляция
Эмбриотрансплантация
МОЭТ
Замораживание эмбрионов



1970/80

Получение эмбрионов in vitro & in vivo

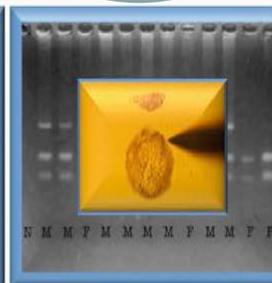
Трансвагинальная аспирация ооцитов (OPU)

1989/97



Определение пола эмбрионов

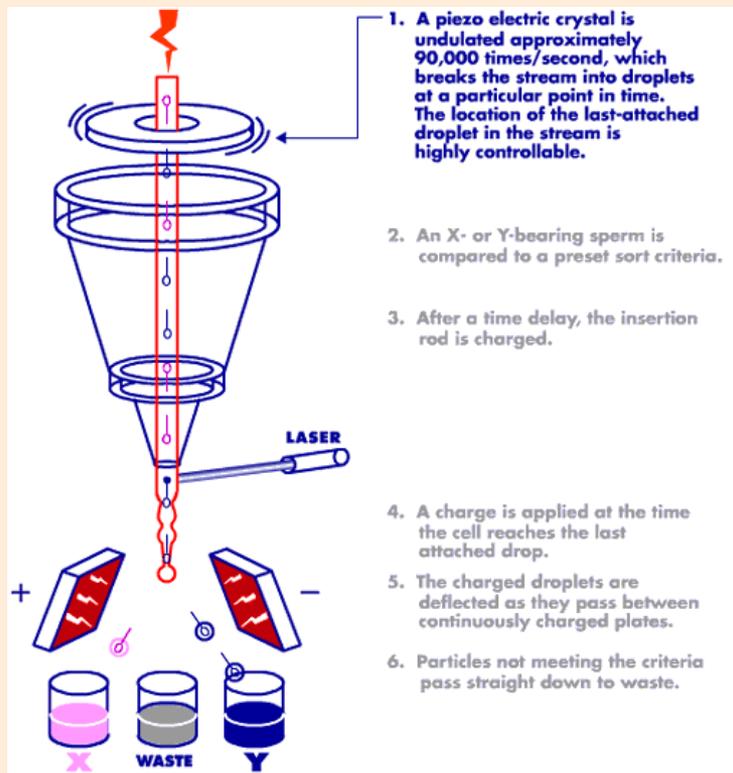
1990



Сексированные сперматозоиды

2000





Биотехнологии в размножении животных

Репродуктивные технологии

Генные технологии

Увеличение числа потомков от высокоценных животных

молекулярный анализ генома животных
генная диагностика (ДНК технологии)
трансгенез

Геномная селекция & искусственное осеменение

Увеличивается точность за счет фенотипирования родственников. Увеличивается интенсивность за счет снижения числа селекционных кандидатов

Искусственное осеменение - не более 50% телочек. Из них до возраста осеменения доходит не более 30%-40%, а вводится в стадо не более 10-15% каждый год.
Улучшение генетического потенциала стада - не менее 9-10 лет.

?

Инновационные клеточные репродуктивные технологий, в том числе разделение семени и генотипирование эмбрионов

Задачи эмбриотрансплантации

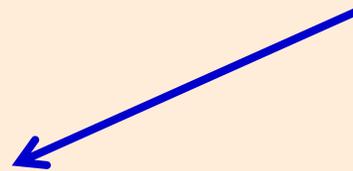
- Увеличение числа потомков от высокопродуктивных животных
- Импорт и экспорт эмбрионов
- Сохранение генетических ресурсов
- Воспроизводство исчезающих видов и пород
- Получение двоен
- Использование «проблемных» животных
- Базовая технология для разработки других репродуктивных технологий

Геномная селекция & трансплантация эмбрионов полученных *in vivo* – МОЭТ (ПОЛИОВУЛЯЦИЯ)



Повышается интенсивность селекции за счет использования элитных коров (процедуру можно повторять каждые 6–7 недель)

Геномная селекция & генотипирование эмбрионов



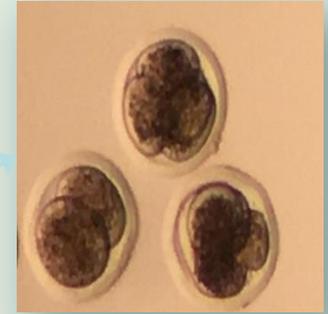
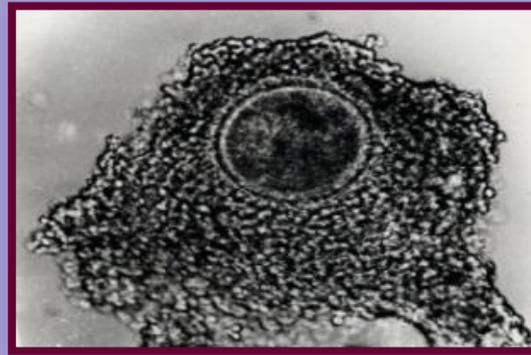
Повышается интенсивность селекции и снижается инбридинг за счет тестирования большого числа селекционных кандидатов. Сокращается интервал между поколениями.

Использование донорских ооцитов животных в клеточных репродуктивных биотехнологиях

Фундаментальные исследования механизмов формирования гамет и их криорезистентности



Получение химер



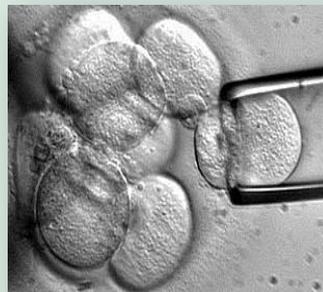
Получение эмбрионов *in vitro*



Клонирование



Сохранение генетических ресурсов (криоконсервация)



Получение линий эмбриональных стволовых клеток

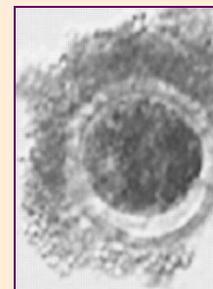
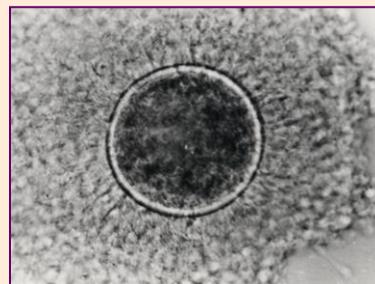
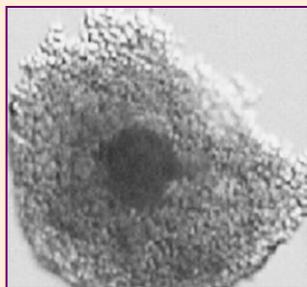
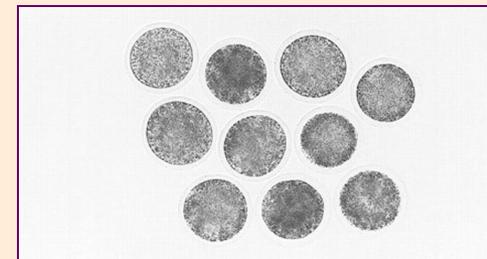
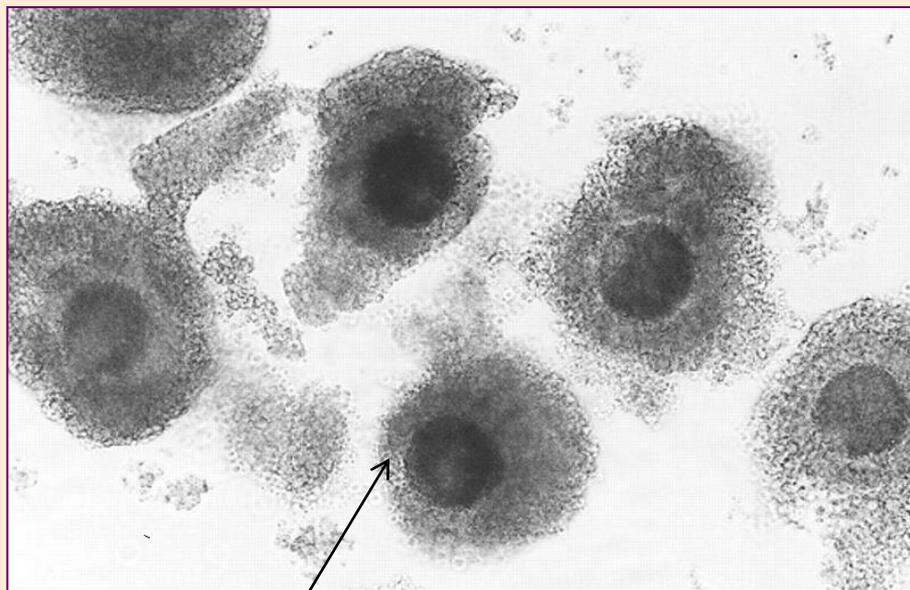
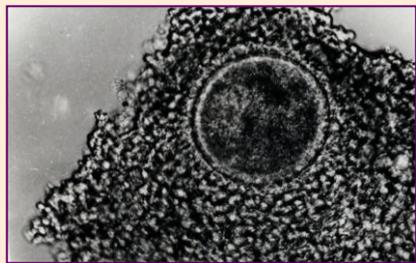


Эмбриотрансфер



Трансгенез

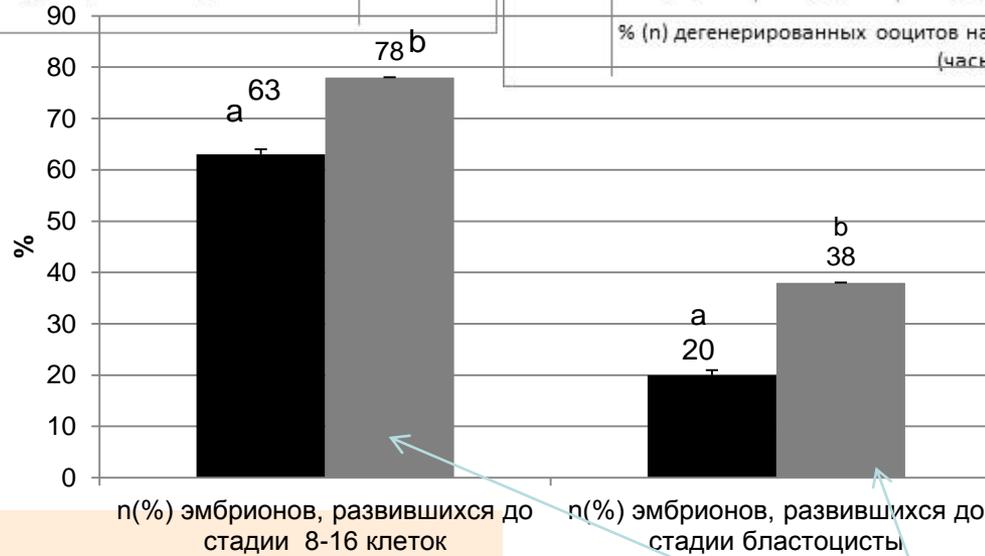
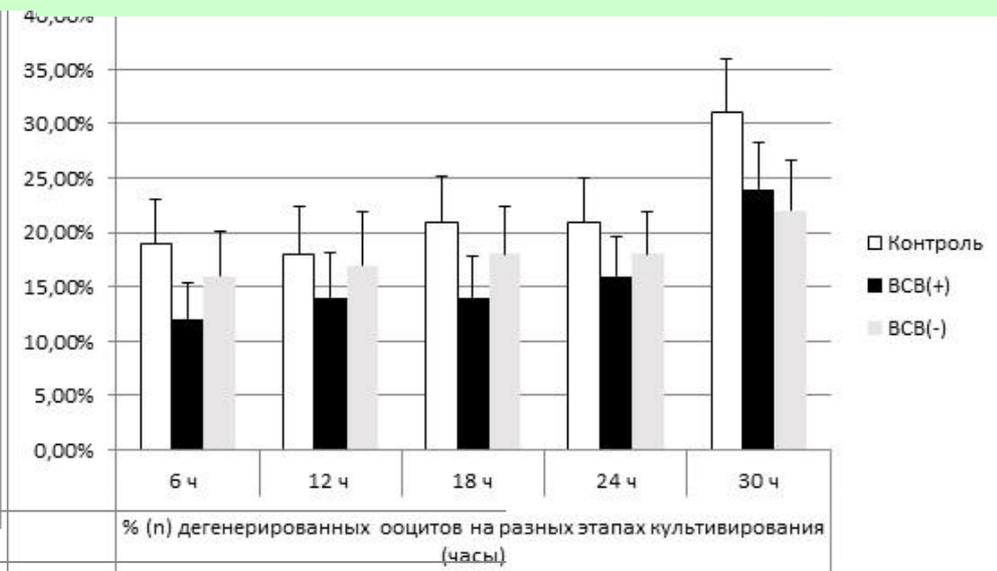
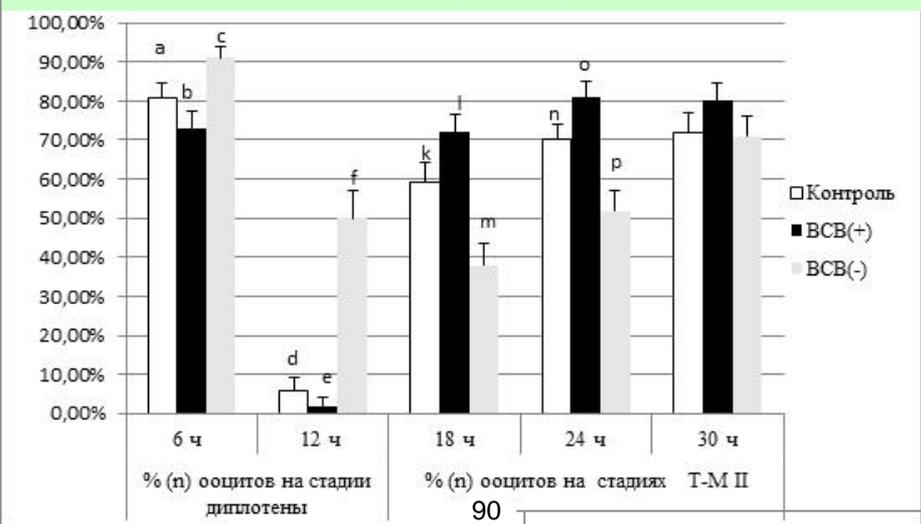
Типы ооцит-кумулюсных комплексов коров



Ооциты, пригодные
для культивирования

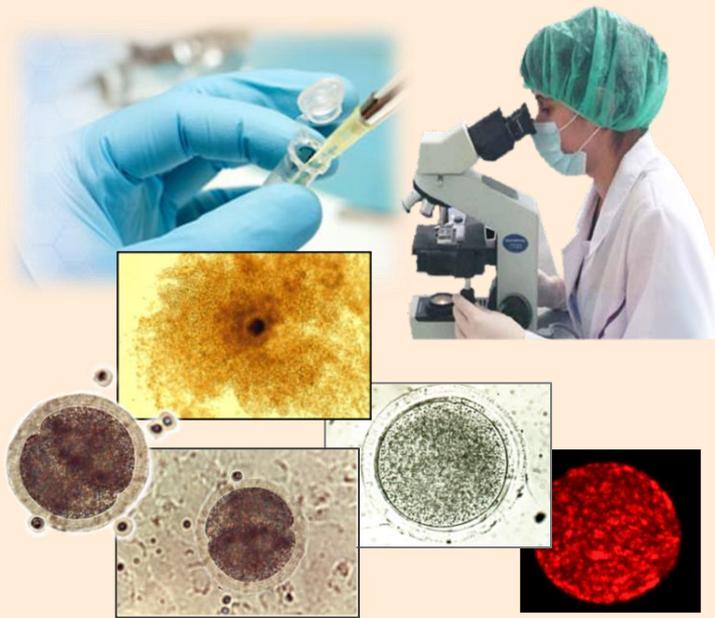
Ядерное созревание ВСВ (+) и ВСВ (-) ооцитов коров (n ооцитов - 1291; число повторностей -4). b: c P <0,05; d: e P <0,05; e: f P <0,05; d: f P <0,05; k: m P <0,05; l: m P <0,05; n: p P <0,05; o: p P <0,05 (критерий χ-квадрат).

Характеристика состояния хроматина в ВСВ (+) и ВСВ (-) ооцитах коров на разных этапах культивирования (n ооцитов - 1279; число повторностей от 3 до 5)

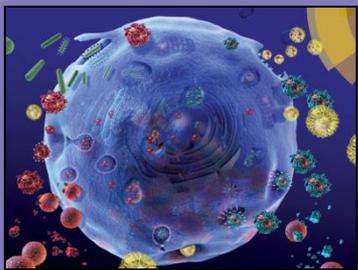


Развитие доимплантационных эмбрионов коров, полученных из ооцитов, не завершивших фазу роста in vivo, созревших при пролонгации культивирования до 30 часов (n ооцитов - 290, n эмбрионов -205). a: b P <0,05 (критерий χ-квадрат).

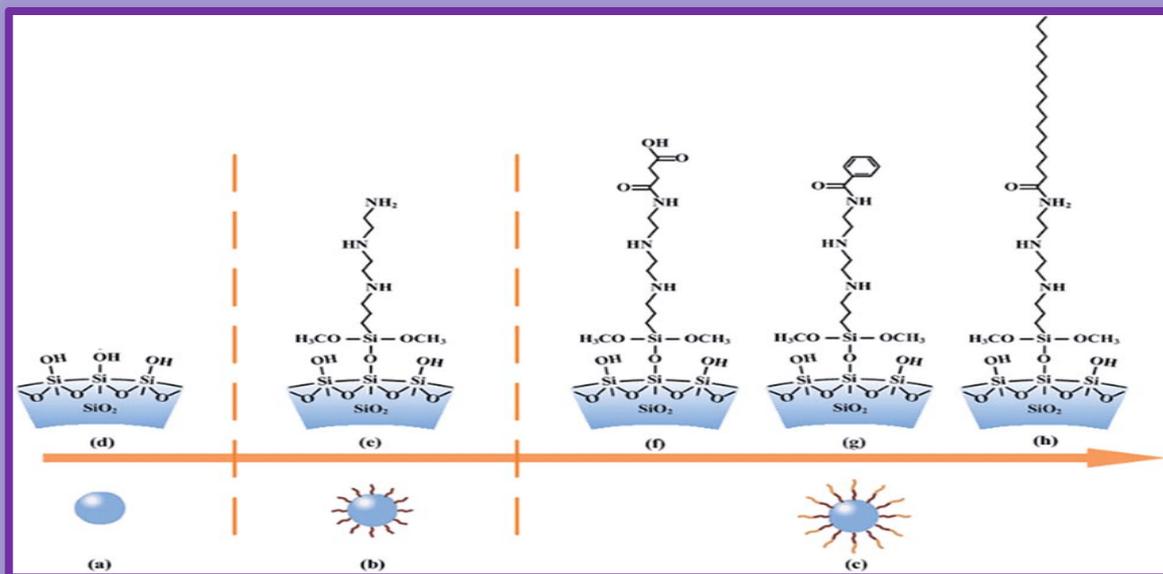
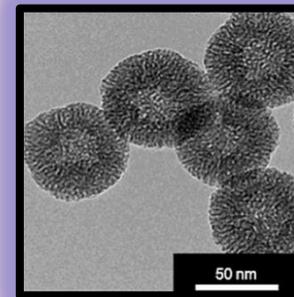
(Патент на изобретение RU №2602448 «Способ экстракорпорального культивирования ооцитов коров»)



Сохранение генетических ресурсов животных
Криоконсервация
репродуктивных клеток (сперматозоидов, ооцитов, культур ЭСК)
и органов (яичников)
эмбрионов



Кремнезем – оксид кремния (SiO_2), широко распространенное в природе. Для получения наноразмерного пирогенного кремнезема производится высокотемпературный гидролиз тетрахлорида кремния в водородно-кислородном пламени (Чуйко А.А., 2003)



нВДК - матрица для синтеза материалов с определенными физико-химическими свойствами, путем встраивания в состав молекулы различных функциональных групп.

Различные типы наночастиц кремнезема: немодифицированные наночастицы кремнезема (а); наночастицы кремнезема, которые в дальнейшем функционализировались органическими

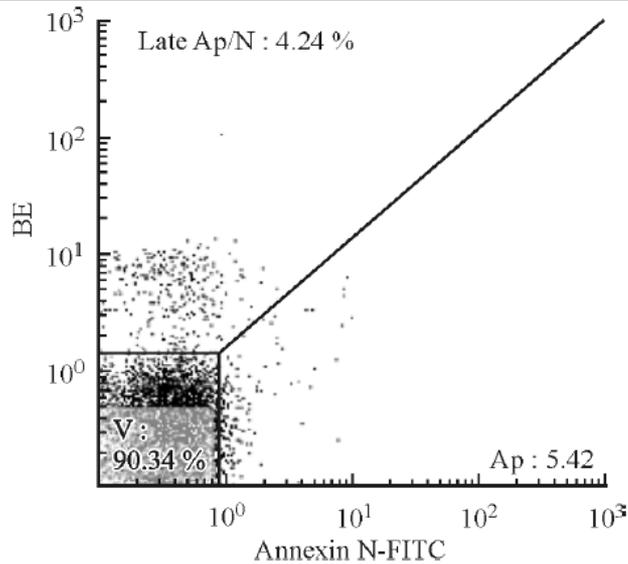


Рис. 2. Распределение сперматозоидов быков по флуоресценции Annexin V-FITC (по горизонтали) и йодистого пропидия (PI, по вертикали) после инкубации в среде с 0.001 % ВДК. Late Ap/N — клетки в состоянии позднего апоптоза и (или) некроза, Ap — клетки в состоянии раннего апоптоза, V — живые клетки.

Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на жизнеспособность нативной спермы быков по результатам теста с аннексином

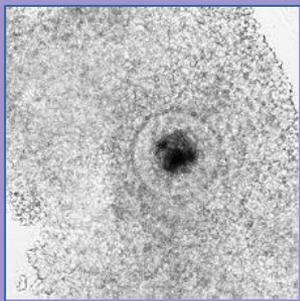
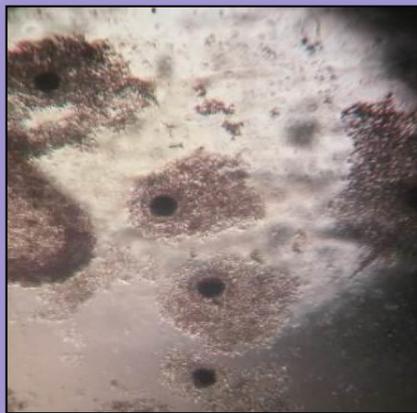
Концентрация ВДК, %	Доля клеток, %		
	живые клетки Annexin V-/PI-	апоптоз Annexin V+/PI-	некроз Annexin V+/PI+
0 (контроль)	90.86 ± 3.09	6.90 ^a ± 2.44	2.24 ± 0.73
0.02	88.28 ± 2.14	7.02 ± 1.82	4.70 ± 2.52
0.01	91.70 ± 1.96	4.94 ± 0.91	3.36 ± 1.70
0.001	91.18 ± 2.82	5.96 ^b ± 1.55	2.86 ± 1.58
0.0001	91.2 ± 2.52	6.56 ± 1.81	2.24 ± 0.71

Примечание. ^{a, б} Различия между отмеченные группы достоверны для $p < 0.03$. Достоверность различия сравниваемых средних значений для 9 независимых экспериментов оценивали с помощью t -критерия Стьюдента. Концентрация клеток в суспензии при проведении измерений ~1 млн/мл.

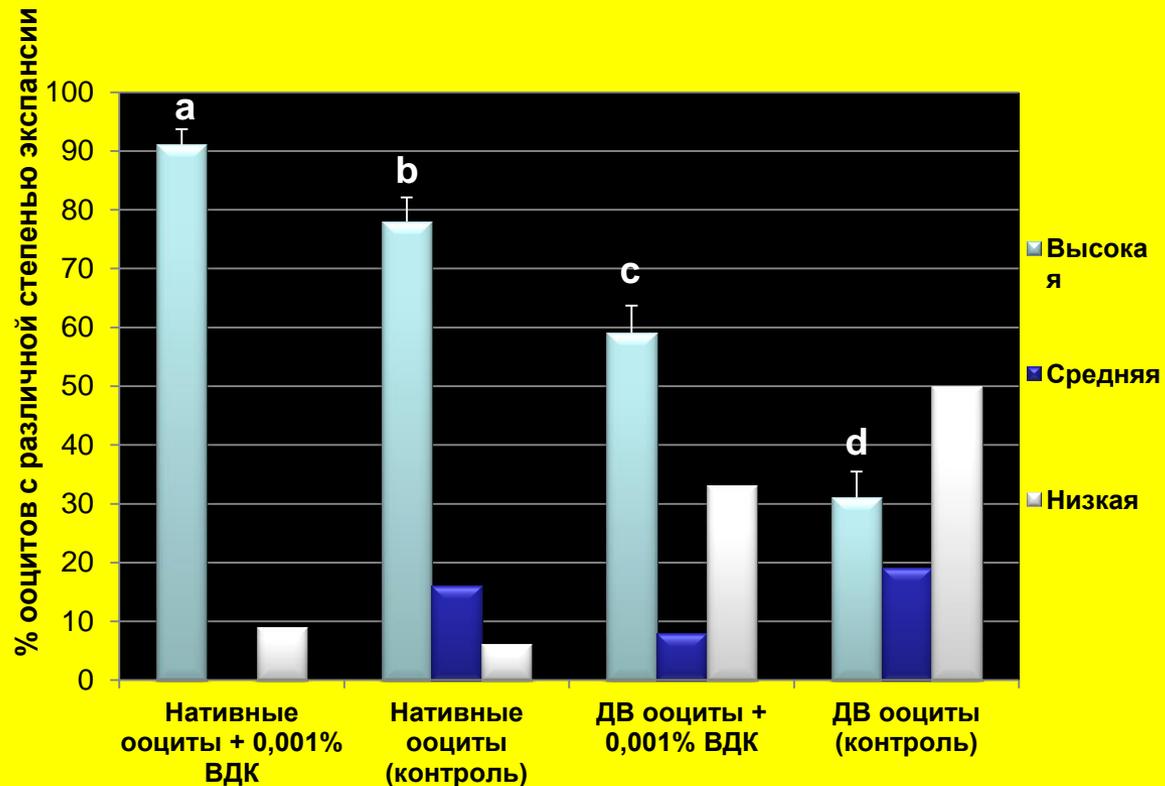
Ковтун и др. (2015) получены данные о положительном влиянии нВДК на качество девитрифицированных ооцитов свиней и сперму быков.

В наших работах эффекты получили объяснение с точки зрения апоптотических процессов: уровень апоптозов при воздействии нВДК в сперматозоидах значительно снижился

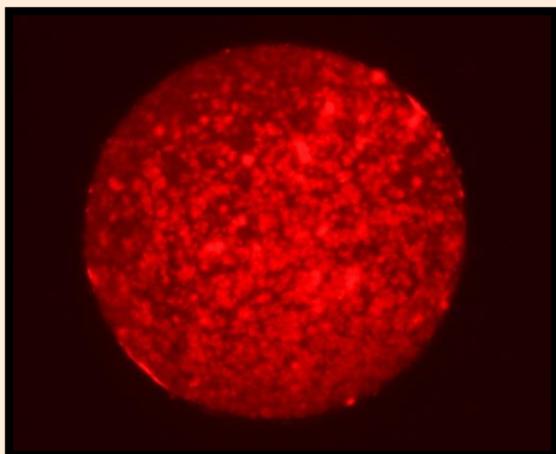
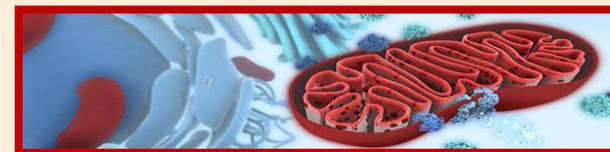
Бойцева Е.Н., Бычкова Н.В., Кузьмина Т. И. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на апоптоз сперматозоидов *Bos Taurus*. *Цитология*, 2017, т.59, №5, с. 375-380.



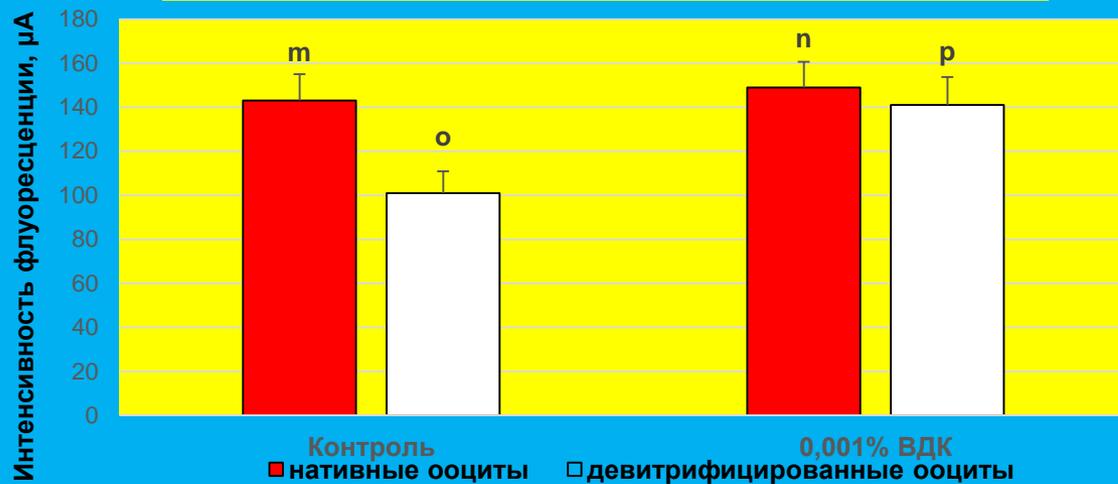
**Влияние ВДК на морфологию кумулюсных клеток
нативных и девитрифицированных ооцитов коров
после 24 часов культивирования
(n ооцитов – 429, n повторностей - 3)**



c:d; b:d; a:c P<0,001; a:bP<0,01 (χ^2 – test)

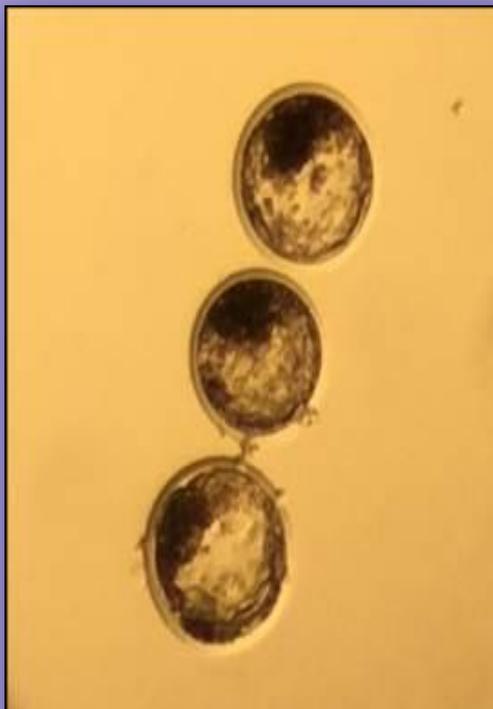


Влияние нВДК на интенсивность флуоресценции Mito Tracker Orange CMTMRos в нативных и девитрифицированных ооцитах коров на стадии метафазы II (n ооцитов – 128, n повторностей - 5)



m;o;o;n;o;p $P < 0.05$ (t-критерий Стьюдента)

Формирование эмбрионов коров на стадии бластоцисты из нативных и девитрифицированных ооцитов при воздействии нВДК (n ооцитов- 466, 3 повторности)



Группа экспериментов	Среда созревания ооцитов	n ооцитов	n (%) бластоцист
Нативные ооциты	*Контроль	123	28 (23) ^a
	*Контроль + 0,001% нВДК	117	48 (41) ^b
Девитрифицированные ооциты	*Контроль	105	5 (5) ^c
	*Контроль + 0,001% нВДК	121	13 (11) ^d

*Контроль:ТС199 + 10% фетальной бычьей сыворотки + 10⁶ клеток/мл гранулезы + 10 нг/мл соматотропина ^{a:b}P<0,01 ^{a:c}P<0,001 ^{a:d}P<0,05 ^{b:c}P<0,001 ^{b:d}P<0,001 ^{c:d}P<0,05 (χ^2 – test)

В наших опытах воздействие нВДК оказывало положительный комбинационный эффект на ядерное созревание девитрифицированных ооцитов, что, вероятно, связано с индукцией антистрессового ответа и ослаблением последствий окислительного стресса

При экстракорпоральном созревании ооцитов было выявлено повышение митохондриального потенциала девитрифицированных ооцитов и снижение доли ооцитов с дегенерированным хроматином при воздействии наночастиц высокодисперсного кремнезема, что может свидетельствовать об усилении ионообменных и репарационных процессов.

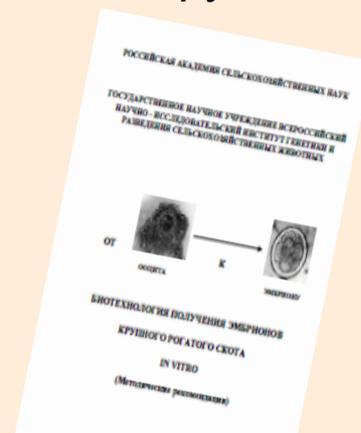
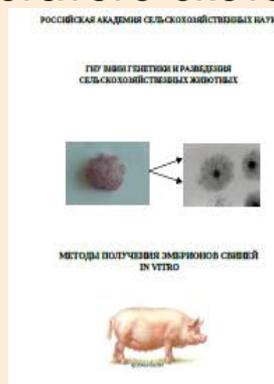
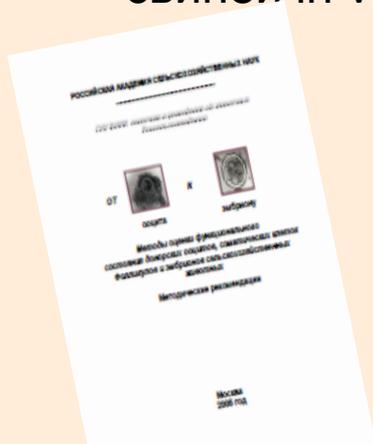
Увеличение митохондриальной активности при достижении девитрифицированными ооцитами стадии метафазы I указывает на усиление энергоснабжения клеток в этот период. Общее снижение трансмембранного потенциала в нативных и девитрифицированных ооцитах на стадии метафазы II может быть связано либо с завершением ядерно-цитоплазматического созревания, либо с наличием большого количества криповреждений в структуре митохондрий (мембранах) и хроматина.



В лаборатории биологии развития:

Разработаны технологии получения эмбрионов коров и свиней, защищенные патентами на способы получения эмбрионов *in vitro*, культивирования ооцитов, получение партеногенетических зародышей, способы оценки функционального состояния ооцитов и др.

Издана серия методических рекомендаций «От ооцита к эмбриону»- «Методы оценки функционального состояния донорских ооцитов, соматических клеток фолликулов и эмбрионов сельскохозяйственных животных.» «Методы получения эмбрионов свиней *in vitro*», «Биотехнология получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*».



На базе лаборатории проводится подготовка специалистов—эмбриотехнологов, мастер-классы по повышению квалификации «Клеточные репродуктивные технологии в животноводстве и биомедицине» (специализация для эмбриотехнологов)

«Omne vivum ex ovo»



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ